

AC

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年 10 月 3 日 (03.10.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/076492 A1(51) 国際特許分類⁷: A61K 38/17, A61P 25/00, 25/28, 25/08

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/07525

(22) 国際出願日: 2001 年 8 月 31 日 (31.08.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-84050 2001 年 3 月 23 日 (23.03.2001) JP(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人
化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION
THE CHEMO-SERO- THERAPEUTIC RESEARCH
INSTITUTE) [JP/JP]; 〒860-8568 熊本県熊本市大塚
一丁目6番1号 Kumamoto (JP).(HIRASHIMA, Masaki) [JP/JP]. 佐々木 巧 (SASAKI,
Takumi) [JP/JP]. 成瀬毅志 (NARUSE, Takeshi) [JP/JP].
前田 浩明 (MAEDA, Hiroaki) [JP/JP]. 野崎 周英
(NOZAKI, Chikateru) [JP/JP]; 〒860-8568 熊本県熊本市大塚一丁目6番1号 財団法人 化学及血清療法研究所内 Kumamoto (JP).(74) 代理人: 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒
540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMP
ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).添付公開書類:
— 国際調査報告書

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 平嶋正樹

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL AGENTS FOR AMELIORATING MOTOR DISORDER

(54) 発明の名称: 新規な運動障害改善剤

(57) Abstract: Novel remedies for neurodegenerative diseases (in particular, agents for ameliorating motor disorder) which contain as the main component(s) selenoprotein P and/or peptide(s) of this protein. These remedies for neurodegenerative diseases (in particular, agents for ameliorating motor disorder) are appropriately usable particularly for diseases in association with depression in motor function.

(57) 要約:

セレノプロテインPおよび/または当該蛋白質のペプチドもしくは当該ペプチド群を主要構成成分とする新規な神経変性疾患治療剤、とりわけ運動障害改善剤が提供される。本発明による神経変性疾患治療剤、とりわけ運動障害改善剤は、とりわけ運動機能の低下している疾患に対して好適に使用できる。

WO 02/076492 A1

明 細 書

新規な運動障害改善剤

技術分野

本願発明は医療用医薬品の分野に属する血漿蛋白質の新たな用途に関する。さらに詳細には、老化や外傷性、脳血管障害、免疫異常性疾患、運動失調症、てんかん、運動ニューロン疾患など神経系を構成する細胞の細胞死や細胞変性に起因する神経変性に対する医薬品に関する。より詳しくは、血漿蛋白質の一種であるセレノプロテインPを、好適には当該セレノプロテインPのC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群を主たる有効成分として含有する神経変性疾患治療剤とりわけ運動障害改善剤に関する。

背景技術

神経系を構成する細胞（神経細胞やグリア細胞など）の細胞死や細胞変性が認められる神経性疾患として、脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、多発性脳梗塞性痴呆、ビンスワンガー型白質脳症、慢性硬膜下血腫などの脳血管障害性疾患、多発性硬化症、ギランバレー症候群、膠原病などの自己免疫性疾患、脊髄小脳変性症、シャイドレーガー症候群、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー症、ピック病、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、進行性核上麻痺、てんかん、プリオン病などの神経変性疾患、さらには老化に付随する痴呆症、歩行障害や、交通事故などによる外傷性の脊髄損傷、脳障害なども知られている。これらのほとんどの疾患では、主症状として運動機能の低下（運動障害）が認められている。

運動障害には、筋の障害、神経の障害、骨や関節の障害などがあるが、そのうち、運動障害をきたす神経中枢性障害について、部位別に分類列举すると、大脳（前頭葉）性、小脳性、前庭（迷路）性及び脊髄性の運動障害症がある。

大脳性運動障害症では大脳皮質、殊に前頭葉性の障害が考えられ、脳血管障害性病変、脳萎縮、外傷、腫瘍、ピック病をはじめ慢性硬膜下血腫などでしばしば問題となる。また、失調性歩行のほか精神機能の低下を示す。

小脳性運動障害症は、小脳障害すなわち小脳腫瘍、血管性障害、変性性疾患、小脳萎縮、奇形などに伴う重要な症状で、小脳虫部の損傷では主として体幹性失調をきたし、起立歩行の障害・蹣跚歩行、大歩行を示し、一般に姿勢、体位保持

が困難で平衡バランス障害をきたす。それに反し、小脳半球性障害では四肢筋トーヌスの異常、筋緊張の低下を示し、患側方向への偏位歩行、協調運動不能、誤示(指一指、指一鼻試験)、運動測定障害、ホームズ・スチュアート現象のほか、企図振戦や小脳性言語(断続性・爆発性)を伴う。

- 5 前庭(迷路)性失調症では、前庭機能障害に由来し、原因としてその多くは耳科的、内耳性障害性疾患の存在あるいは後遺症としてみられる。例えば、メニエール病、突発性難聴、ストレプトマイシンやカナマイシンなどの薬物中毒による平衡神経の障害、外傷、梅毒、音響外傷、耳硬化症、内耳炎(及びその続発症)が挙げられる。

- 10 脊髄性運動障害症は、別名後索性運動失調症と呼称するごとく、脊髄後索障害により深部感覚の障害すなわち、位置覚、関節覚、握覚の障害により失調をきたすものである。フリードライヒ運動失調症、亜急性脊髄連合変性症、脊髄癆などで特徴的にみられる。

- これらの運動障害を呈する神経変性疾患は神経細胞死や細胞変性と病態が深く
15 関係している。例えば、ハンチントン病、脊髄小脳変性症(マシヤド・ジョセフ病、フリードライヒ失調症など)、筋緊張性ジストロフィーなどに見られるポリグルタミン病やアルツハイマー病などでは、異常蛋白の細胞内蓄積による神経細胞死や変性が認められている。運動ニューロン疾患でも、その代表例である筋萎縮性側索硬化症において、フリーラジカルの発生、グルタミン酸の過剰蓄積による
20 神経細胞死、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇、NO発生などが、病因と考えられている。さらに、パーキンソン病では黒質緻密層ドーパミン性神経細胞の変性が主病変と考えられている。

- 人は老化が進むにしたがって進行的な身体機能の低下が観られる。これら変化の基礎を成す形態の老化として臓器は萎縮(重量の減少)する。例えば、老化が
25 進行すると脳萎縮がみられ、顕著な場合には、歩行障害や痴呆症になる。組織病理学的には、神経細胞の変性あるいは脱落、老人斑、アルツハイマー原線維変化などがみられる。これらの神経系の細胞死や変性はフリーラジカルなどの酸化ストレスやグリケーションによって生じているといわれている。また、剖検脳の生化学的知見として神経伝達物質の減少、ことにコリン作動系ニューロンの障害が報

告されているが、なお病因は不明である。

さらに、健常人でも、交通事故などによって脊髄や脳を損傷して、歩行障害になることがある。事故などで強力な外力が加わり、脊椎の脱臼骨折がみられると脊髄に圧迫や挫創が起こり、脊髄が損傷される。原因にはその他放射創、切創、
5 刺創がある。骨傷の明白でない場合もあり、頸椎の過伸展損傷でよくみられる。病態は、脊髄実質に出血、浮腫を基盤とした脊髄の挫滅と圧迫病変である。臨床症状として不全あるいは完全横断麻痺が出現する。

自己免疫疾患によって運動障害が生じる場合がある。免疫系は本来外界からの有害な異物の侵入に対する生体の防御機構として存在するものである。しかし時
10 にはこの免疫系の働きが、結果的に生体に有害であることがある。これをもとにある病態が生じた時には、自己免疫疾患と呼ぶ。この自己免疫反応が原因で、運動障害を呈する疾患として、重症筋無力症、多発性硬化症、慢性関節リウマチなどが知られている。

例示される多発性硬化症は、脱髄疾患の一種で、中枢神経系の白質に大小さまざまな脱髄巣が散在し、その病巣もまた新旧様々なものが存在することを特徴とする。病巣は側脳室周囲、視神経、脳幹、脊髄などの白質に好発する。組織学的には髄鞘を形成するオリゴデンドロサイトが傷害される疾患であり、病巣にアポ
15 トーシスを起こした細胞が多数認められる。脱髄巣は早期には炎症性細胞浸潤があるが、慢性期になるとグリア線維で置き換えられて硬化する。臨床症状は視神経炎、複視、眼振などの眼球運動障害、痙性麻痺、有痛性強直性痙攣発作、レルミット症候群、失調症、言語障害、膀胱直腸障害などの症状がいろいろな組み合わせで出現し、しかも寛解を示すことに特徴がある。
20

脳血管障害性疾患においては、脳梗塞や脳内出血など様々な要因によって生じた脳の虚血状態が、一般的に虚血領域の細胞や組織に酸素欠乏と栄養障害をもたら
25 らし、酸素欠乏はATP産生の途絶を介して、まず機能が障害され、ついには変性、壊死、あるいは萎縮をきたす。具体的には、虚血に伴う酸素とグルコースの供給低下が引き金となり、フリーラジカルの発生、グルタミン酸の過剰蓄積、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇、NO産生の増大などが見られ、神経細胞死を引き起こしている。この障害は虚血時間に依存し、虚血時間が長いほど再灌流時

の障害も悪化する傾向にある。これらのことから、神経細胞死や細胞変性により運動機能にも障害を呈することになる。

発明の開示

(発明が解決しようとする技術的課題)

5 以上述べてきたように、疾患の種類こそ異なるものの、運動障害を呈する神経変性疾患には、共通する病因として神経細胞死や細胞変性が考えられている。従って、この神経細胞死や変性を抑制あるいは改善するような効果を持つ物質は、前述のような神経変性疾患、とりわけ運動障害の治療薬になると考えられる。現在、これらの症状を改善するために、種々の薬剤が試みられている。例えば、ス
10 ーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼほか多数の生体の酸化障害に対する予防、制御物質のほか、実際に治療に用いられている虚血性心疾患治療剤である塩酸トリメタジジン、トロンボキサン合成酵素阻
害剤であるオザグレルナトリウム、脳循環代謝改善剤である酒石酸イフェンプロ
15 ジル、虚血性脳障害改善剤であるフマル酸ニゾフェノンなどもあるが、これらにより障害が完全に抑制できるわけではない。

このように神経細胞死や神経変性を伴う運動障害について、症状を改善する有効な治療薬はほとんど知られておらず、そのため対処療法が主体となっている。例えば、手の震えなどのパーキンソニズムにはパーキンソン病治療薬、起立性低
20 血圧などの自律神経症状には自律神経調整薬が使われている。従って、神経細胞死や細胞変性によって生じる運動障害を改善するためには、前述のように、神経細胞にとって悪条件下で生じる細胞死や細胞変性を抑制する物質、中でも細胞内抗酸化能を上昇させる物質が切望されている。

なお、上記の記述（背景技術及び発明が解決しようとする技術的課題）は、
「虚血によりなぜ細胞は死ぬのか」田川邦夫著、共立出版；「脳卒中ハンドブック」佐野圭司、アイ・ピー・シー；「今日の診療」CD-ROM版、医学書院；
25 「医学大辞典」CD-ROM版、南山堂；「最新医学大辞典」CD-ROM第2版、医歯薬出版、「アポトーシスと疾患」水野美邦編、医薬ジャーナル社の記述を参考にした。

(その解決方法)

上述の状況の下、本願発明者らは先に、血液成分由来の蛋白質であるセレノプロテインPに、そしてより好適な態様として当該セレノプロテインPのC末端側ペプチドに、従来報告されていなかった細胞死抑制活性が認められることを見出し、この知見を基に特許出願した(PCT/JP99/06322)。さらに、本願

5 発明者らは、新たな神経変性疾患改善剤、とりわけ運動障害改善剤を供するべく鋭意研究した結果、驚くべきことに従来試みられることのなかった前記セレノプロテインPまたはそのC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群が、モデル動物での実際の生体内投与によって、運動障害改善剤として人間その他の動物に充分に適応できる事実を見出し、この知見に基づいて本願発明を完成するに至った。

10 すなわち、本願発明は、セレノプロテインPおよび／または当該蛋白質のC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群を主要構成成分とする運動障害改善剤に関する。

本願発明の好ましい態様において、前記蛋白質のC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群は、セレノプロテインPのC末端側103アミノ酸配列、1もしくは

15 は数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された当該アミノ酸配列、前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記アミノ酸配列をその一部に含有するアミノ酸配列を有するペプチドまたは当該ペプチド群である。

本願発明のさらに好ましい態様において、前記蛋白質のC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群は、次式、

20 (I): Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu
Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu (配列番号1)

および／または

(II): Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu
Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile (配列番号2)

25 (式中、Xaaはセレノシステインを表す)

で表されるアミノ酸配列、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された当該アミノ酸配列、前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記いずれかのアミノ酸配列をその一部に含有するアミノ酸配列を有するペプチドまたは当該ペプチド群である。

図面の簡単な説明

図1はスナネズミの両頸動脈遮断誘導運動障害に対するセレノプロテインPの改善効果を示す図である。

5 図2はマウスEAEにおける運動障害に対するセレノプロテインPの改善効果を示す図である。

図3はセレノプロテインPを添加した場合（SeP(+)）と添加しない場合（SeP(-)）に観察される培養ヒト神経細胞の顕微鏡写真である。セレノプロテインPを添加した場合には培養ヒト神経細胞に突起形成が認められる。

発明を実施するための最良の形態

10 セレノプロテインPは1977年にグルタチオンペロキシダーゼ (glutathione-peroxidase) とは異なるセレン含有蛋白質として確認され、1982年にセレンがセレノシステイン(selenocysteine)の形態で取り込まれていることが明らかにされた。さらに、1991年にセレノプロテインPのcDNAのクローニングにより全長のアミノ酸配列が明らかにされ、その結果、当該蛋白質は
15 最大10個のセレノシステインを含む可能性等が示された(Hill K.E. 及びBurk R.F., Biomed. Environ. Sci., 10, p. 198-208 (1997))。セレノプロテインPの機能はほとんど不明であったが、最近、in vitroの系でphospholipid hydroperoxideやperoxynitriteの還元活性、神経細胞のsurvival promoting factorとしての作用が見出された。

20 具体的な事例として、老化のモデルマウスであるクロトーマウスにおいて、顕著な運動性の回復が認められ、さらに、多発性硬化症のモデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎(experimental allergic encephalomyelitis: EAE)でも発症抑制効果と症状低減効果が認められ、運動障害症の改善作用があることが判明した。また、脳血管障害性疾患のモデルである、スナネズミの両頸動脈遮断実験において、虚血・再灌流後の神経症状、とりわけ運動障害改善に有効であるこ
25 とも示された。さらに、セレノプロテインPに培養神経細胞に突起を形成させる作用があることが分かり、細胞ダメージから機能回復させる作用もあることが示された。これらのことから、神経系においては、虚血・再灌流障害だけでなく、病因には依存せずに、神経障害、とりわけ運動障害症状を改善する作用をセレノ

プロテインPが有していることが示された。

本願発明は、セレノプロテインPの前記知見に基づく新たな薬効に関するものであり、本願発明の神経障害改善剤の本態はセレノプロテインPである。さらに詳細には、セレノプロテインPの中のセレンを含むセレノシステインに特徴があり、このアミノ酸が神経障害とりわけ運動障害の改善作用の中心アミノ酸であると思われる。本願発明者らは、先の特許出願において、血液成分由来の蛋白質であるセレノプロテインPのC末端側ペプチド断片に従来報告されていなかった細胞死抑制活性が認められることを開示した。この活性にも、含有されるセレノシステインが関与していることが明らかである。従って、セレノシステインを含み細胞死抑制活性を持つ蛋白質及び／またはペプチド群は、運動障害改善剤の候補となりうる。

そもそも、本願発明に係るセレンは、微量必須元素の一つであり、それが欠乏した場合には心筋症などを伴う重篤な欠乏症が知られている。また、無血清培養の培地に亜セレン酸ナトリウムの添加が必須であることから、セレンが細胞レベルでの生存維持・増殖に必須であることが示されている。しかし、セレン化合物が毒物指定されていることから理解されるように、有効量と危険量の幅、つまり安全域の濃度幅が狭く、適量以上のセレン化合物は一般的には細胞にとって毒性を示し、逆に細胞死を誘導する。例えば、セレンの急性中毒症状として、顔面蒼白、神経症状、神経障害、皮膚炎、胃腸障害などが知られている。また、細胞培養にセレノシステインの2量体であるセレノシスチンを添加すると、単独ではかなり強い毒性を示す。これに対して、本願発明の好適な態様であるセレノプロテインP、セレノプロテインPのC末端側断片は、その構造中に9～10個のセレノシステインを含むにも拘わらず、強い毒性は観察されなかった。このことから、本発明の薬効作用を示すセレノプロテインPの特徴として、セレノシステインを含み、なおかつ毒性が減弱していることが重要と思われる。本願発明のペプチドまたは当該ペプチド群は、毒性の低減というセレン化合物に対する命題を克服するのみならず、予期し得ない運動障害改善作用をもたらすことを可能とするものである。

ここで用いられるセレノプロテインPに特段の制約はなく、所望の運動障害改

善活性を有するものであれば如何なる分子形態のものをも包含する。すなわち、完全分子型セレノプロテインPをはじめ種々の分子形態のものが対象となり得る。この中で、好適な態様はセレノプロテインPのC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群であり、中でもC末端側103個(260位から362位まで: 260Lys
5 Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile Thr Glu Ser Cys Gln Xaa Arg Leu Pro Pro Ala Ala Xaa Gln Ile Ser Gln Gln Leu Ile Pro Thr Glu Ala Ser Ala Ser Xaa Arg Xaa
10 Lys Asn Gln Ala Lys Lys Xaa Glu Xaa Pro Ser Asn362 (式中、Xaaはセレノシステインを表す) (配列番号3) のアミノ酸配列または当該アミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列または、前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記アミノ酸配列を含有するアミノ酸配列を有するペプチドまたは当該ペプチド群は、とりわけ好適な態様として
15 推奨され得る。

なお、本願明細書で用いる「当該ペプチド群」とはセレノプロテインPのアミノ酸配列に由来し、少なくとも1個のセレノシステインを含むペプチドで、当該アミノ酸配列のうち1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、糖鎖の有無、荷電の相違、断片化の多様性等に起因する微
20 細構造の異なるペプチドの集合体を意味する。すなわち、本願発明のセレノプロテインP及びペプチド群は、セレノプロテインPのアミノ酸配列に由来し、細胞障害抑制活性を有するものであればその分子形態に特段の制約はなく、これらには完全分子型のセレノプロテインPをはじめこれに起因するC末端側ペプチド等が含まれる。このような本願発明のペプチドは、ペプチド合成機を用いて常法に
25 従って調製することもできるし、また、本願発明のペプチドをリード物質として、化学合成物をデザインすることも可能である。

本願発明に使用されるセレノプロテインPまたは当該蛋白質に由来するペプチドもしくはペプチド群を製造する方法は特に限定されるものではないが、例えばヒト血液より分離する方法、または遺伝子組換え技術により製造することができ

る。本願発明に使用される運動障害改善剤の主要構成成分となるセレノプロテインPまたは当該蛋白質に由来するペプチドもしくはペプチド群は、一般的な酵素類よりも熱、変性剤、幅広いpH、血中のプロテアーゼに対して安定であるため、これを精製同定するに際しては、一つの態様として、血漿を出発原料とし種々のクロマトグラフィー工程、例えば、ヘパリンクロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー、抗体カラムの様な各種アフィニティークロマトグラフィー等、適用可能な種々の担体を用いた分画方法の他、硫酸アンモニウム沈殿分画、分子量膜分画、等電点分画、電気泳動分画等、種々の分画法が利用可能である。これらの分画法を組み合わせることにより、所望のセレノプロテインPまたはペプチドもしくはペプチド群を分画することが可能である。その望ましい組み合わせの一例を調製例1に示す。

本願発明では、有効成分としての当該蛋白質またはペプチドもしくはペプチド群と公知の適当な賦形剤を組み合わせ、公知の方法で本願発明の運動障害改善剤とすることができる。本願発明の運動障害改善剤の有効投与量は、投与対象者の年齢、症状及び重症度などにより変動し、最終的には医師の意図により変動する。薬効は投与方法には依存しないが、皮下、皮内、腹腔への投与、血管内への単回（ボラス）投与あるいは点滴投与などが最適である。また、分子量の小さなペプチド群の場合は、経口投与や経皮投与なども可能である。

本願発明の神経障害改善剤の投与対象は、神経細胞死あるいはその細胞変性に起因し、神経症状を呈する疾患、とりわけ運動機能の低下している疾患であれば特に限定されることはない。例えば、脳梗塞、脳出血、くも膜下出血、多発性脳梗塞性痴呆、ビンスワンガー型白質脳症、慢性硬膜下血腫などの脳血管障害性疾患、虚血性臓器障害、臓器移植等再灌流障害、血管性障害、神経障害、動脈硬化及び心筋梗塞等、神経変性疾患では、多発性硬化症、ギランバレー症候群、膠原病などの自己免疫性疾患、脊髄小脳変性症、シャイドレーガー症候群、マチャド・ジョセフ病、筋緊張性ジストロフィー、フリードライヒ失調症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー症、ピック病、ハンチントン舞蹈病、パーキンソン病、

進行性核上麻痺、てんかんなどの神経変性疾患、さらには老化に付随する痴呆症、歩行障害や、交通事故などによる外傷性の脊髄損傷、脳障害などがその対象として考慮され得る。中でも、運動失調症、てんかん、運動ニューロン疾患、老化や外傷性の疾患、脳血管障害性疾患、免疫異常性疾患に分類されるものが最適対象と考えられる。運動障害のような神経障害改善剤として本願発明のセレノプロテインPまたはこれに由来するペプチドもしくはペプチド群を主要構成成分として含有する薬剤を使用する場合、本薬剤を単独で投与することもできるし、他の治療薬剤との併用投与も効果を増大させるための有効な手段として期待できる。また、予防的または治療的投与のいずれにおいても効果が期待できる。

- 10 本願発明により、種々の病因に起因する神経変性疾患、とりわけ運動機能の低下している疾患に対する好適な神経障害改善剤が提供される。

以下、調製例及び実施例に沿って本願発明をさらに詳細に説明するが、これらは本願発明の範囲を何ら限定するものではない。なお、以下に示す調製例及び実施例では、特に断りのない限り、和光純薬、宝酒造、東洋紡、及びNew England
15 BioLabs社、ファルマシヤ社、バイオラド社、シグマ社、ギブコBRL社製の試薬を使用した。

調製例 1

(セレノプロテインP断片に対する抗体結合担体(抗S e P抗体カラム)を用いたセレノプロテインP断片の精製)

- 20 血漿中のヘパリンセファロース結合画分を2M硫酸アンモニウムにより沈殿させ、その沈殿画分に対して5倍以上の20mM Tris (pH8.0)により沈殿を溶解させた。この溶液に存在するセレノプロテインPを抗S e P抗体カラムに結合させ、PBSで洗浄した。その後4M尿素を含有する20mMクエン酸バッファーによりセレノプロテインPを溶出し、20mMクエン酸バッファーで平衡
25 化した陽イオン交換体(Macroprep High S: BioRad)に結合させた。これを塩化ナトリウムによる塩濃度勾配溶出を行ない、細胞死抑制活性を示す画分を回収した。この時、全長のセレノプロテインPを得ることが可能であるが、蛋白あたりの細胞死抑制活性は明らかに弱い値を示した。本方法では、短時間の精製が可能であるため、蛋白あたりの細胞死抑制活性の強いセレノプロテインP断片を得ること

ができた。ここで得られた断片もまた、糖鎖の有無、分子間結合の有無、内部切断の有無などにより種々のサイズの分子種を含む混合画分であり、非還元電気泳動で10～30 kDaのサイズを示すセレノプロテインP断片群であった。

実施例 1

5 (細胞障害抑制活性)

細胞障害抑制活性のアッセイ系に使用するDami細胞(Greenberg S.M.ら、Blood vol. 72, p. 1968-1977(1988)に記載)を用いて、アッセイ培地(50% PBS/SA/0.03% HSA(SIGMA社製))またはSA/0.05%脱脂肪酸BSA(WAKO社)/4 μ Mの長鎖多価脂肪酸(アラキドン酸、リノール酸または
10 リノレン酸等)により2回洗浄して 3×10^4 細胞/mlになるように懸濁後、得られた細胞懸濁液をサンプル添加ウェルのみ200 μ l、段階希釈のためのウェルには100 μ lずつを96wellプレートに分注した。サンプル添加ウェルにアッセイ試料として調製例1で得られたセレノプロテインP断片及び、セレノシスチン、セレノメチオニン、エプセレン、亜セレン酸ナトリウムについて同一
15 濃度の溶液を調製し、それらを2 μ l添加し攪拌後、100 μ l細胞懸濁液が入ったウェルに対して段階希釈した。そして、37℃のCO₂インキュベーターで4～5日間培養し細胞の生死を判定した。

その結果、調製例1で精製したセレノプロテインP断片以外に、その断片より還元状態で精製したペプチド(Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu
20 Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile Phe Glu Lys (配列番号4)にも細胞障害抑制活性のあることを確認した。一方、セレノプロテインP由来のセレノシスチンを含まないペプチド(Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu Leu Ala Pro Arg Ser) (配列番号5)には活性がないことが分かり、セレノプロテインP活
25 性にとってセレノシスチンが重要であることが示された。

実施例 2

(脳虚血再灌流障害モデルにおけるセレノプロテインP断片の虚血・再灌流障害抑制効果)

セレノプロテインPの脳虚血再灌流障害による運動障害に及ぼす影響を麻痺の

度合いで確認するために、12週齢のスナネズミを用いて評価した。塩酸ケタミン(100mg/kg)の腹腔内注射にて全身麻酔をかけ、正中切開にて頸静脈を露出させ、本願発明のセレノプロテインP断片を1mg/匹の量で静脈内投与した。30分虚血、45分間虚血を行なった後、血流を再灌流させ、6時間後及び24時間後の麻痺の度合いにより評価した。

6時間後及び24時間後の麻痺の状態を表1に示すスコアで判定し評価した。

表1

正常	0
前足に軽い麻痺があり、足を曲げた状態で動きが鈍い	1
足の麻痺が多少悪化し、片側に回り続ける	2
麻痺が悪化し、片側に倒れる	3
更に麻痺が悪化し、動けない状態になる	4
死亡	5

図1に示すように、30分虚血モデルにおける6時間後の麻痺の状態及び24時間後の麻痺の状態を評価すると、セレノプロテインP断片投与群の方が明らかに症状が良好である結果が得られた。また、45分虚血モデルでは6時間後の麻痺の度合いは大差ないが、24時間後の麻痺の度合いに大きな差が観られた。

実施例3

(クロトー(Klotho)マウスへのセレノプロテインPの投与による運動失調の改善効果)

老化に伴随する運動機能低下の改善を目的として、クロトーマウス(Nature, 390:45-51, 1997)を用いて本願発明のセレノプロテインP断片の効果を確認した。クロトーマウスは、1997年に京都大学大学院医学研究科の鍋島陽一先生らが作出した老化モデルマウスで、平均寿命は60日、生後20日頃から発育が遅延し、生後100日以内にほぼ全例が死亡する。Klotho遺伝子変異のため、動脈硬化症、肺気腫、皮膚萎縮、性腺萎縮(卵子や精子が減数分裂しない)、神経変性(小脳Purkinje細胞の脱落、運動失調症)、脳下垂体の機能異常(成長ホルモンの生産低下、成長障害)、骨粗鬆症(軟部組織や軟骨の異所性石灰化)など、老化に関連した異常が認められるマウスである。Nature, 390:45-51, 1997に記載され、クロトーマウスは京都大学大学院医学研究科の鍋島陽一先生の許可を得て日本クレアより入手した。

1 群4匹の4週齢のクロトーマウスに対して8週齢まで、生理食塩水に溶解した調製例1で得られたセレノプロテインP断片(1.5mg/ml)及び生理食塩水を毎週300μlずつ腹腔に投与し、その状態変化を観察した。その結果、生理食塩水投与群、セレノプロテインP断片投与群ともに、4週齢からの体重の増加は観察されず、根本原因を解決する事は無かった。しかし、その行動を比較するとセレノプロテインP断片投与群が手のひらに乗せた際、自発的に逃げるために飛び降りることが可能であるのに対し、生食投与群は自発的な逃避行動をとることが出来なかった。これはセレノプロテインP断片による運動能低下の改善効果を示すものと考えられた。

実施例4

(マウス実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE))

セレノプロテインPの免疫異常性疾患による運動障害に及ぼす影響を麻痺の度合いで確認するために、マウスEAEでのセレノプロテインP投与実験を行った。動物として、SJL/JOrIICrj、メス、14週令(日本チャールズリバー)を用い、免疫原としてmyelin proteolipid protein(PLP) synthetic peptide 139-151 (アミノ酸配列: His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe) (配列番号6)を25mg/マウスで、フロイント完全アジュバントH37Ra(400mg/マウス)と百日咳菌毒素(List Biological Laboratory社製; 200ng/マウス)とともに尾根部2箇所皮内投与した。

1 群13匹で、セレノプロテインPを発症前日(8日目)から13日目まで毎日、0.5mg/headで腹腔内投与した。対象として同様にSalineを腹腔投与した。発症後、その麻痺の程度を表2に示すスコアで毎日判定し、評価した。

表2

正常	0
尾が不完全に垂れ下がった状態	0.5
尾が完全に垂れ下がった状態	1
後肢の軽度の麻痺	2
後肢の中度から重度の麻痺)または前肢の軽度の麻痺	3
後肢の完全麻痺及び/または前肢の中度から重度の麻痺	4
四肢の麻痺または瀕死	5
死亡	6

その結果、図2に示すように、セレノプロテインP投与群に、発症の抑制と重症度の軽減効果が認められた。さらに、10日目の発症率を比較すると、Saline投与群は13匹中12匹が発症しているにもかかわらず、セレノプロテインP投与群では13匹中4匹しか発症していない。このことから、セレノプロテインPには免疫異常性疾患における発症の抑制効果と運動障害の軽減効果があることが示された。

実施例5

(培養ヒト神経細胞の突起形成に対するセレノプロテインPの効果)

NT2 (Ntera 2/D1) (Pleasure, S.J. 及び Lee, V.M. 1993 J. Neurosci. Res. 35: 585-602) はヒト奇形癌由来の神経前駆細胞であり、レチノイン酸により中枢神経系の神経の性状を示すhNT神経細胞へと分化させることが可能である(Trojanowski, J.Q. ら、1993 Exp. Neurol. 122: 283-294)。このhNT細胞の突起形成に対するセレノプロテインPの効果を検討した。

NT2、hNT細胞ともに37℃、CO₂インキュベーターで培養可能であり、hNT細胞は以下の操作により得た。まず、10%FCS/D-MEM/F-12培地で継代培養可能であるNT2細胞を2.5×10⁵細胞/mlでプレーティングしておき、24時間後に10μM alltrans retinoic acid を含むD-MEM/F-12に培地を交換して誘導を開始した。その後3日毎に同培地を交換し、6週間培養することによりNT2細胞をhNT細胞へ分化させた。分化した細胞を全て回収後、10%FCS/D-MEM/F-12培地により3倍に拡張継代培養した。更に48時間後に3-4×10⁶細胞/mlになるようにプレーティングした。48時間培養後に5%FCS/D-MEM/F-12プラス mitotic inhibitor(10μM Fluorodeoxyuridine, Uridine, 1μM cytosine arabinoside)に培地を交換、3日毎に同培地を交換しながら10日間培養した。その後、短時間のトリプシン処理後、軽いタッピングで遊離してくるhNT神経細胞を回収した。回収した細胞はNT2培養上清(10%FCS/D-MEM/F-12)と新しい10%FCS/D-MEM/F-12を等量混合した培地に懸濁後、Lamininコートプレートにプレーティング後、細胞を維持した。このようにして得られたhNT細胞を実験に用いた。

- 得られたhNT細胞はトリプシン処理により細胞回収後、RPMI 1640、D-MEM、F-12を1:2:2で混合した基礎培地により洗浄後、同培地懸濁後96穴プレートに3000細胞/wellで培養を行うと、5~7日目に完全に死滅した。それに対して、セレノプロテインPを100ng/ml添加すると完全に細胞死が抑制され、その状態で、2週間以上維持可能であった。また、
- 5 培養4日目に細胞形態を観察すると、図3に示すように、セレノプロテインP添加では、突起形成が認められた。このことより、セレノプロテインPに神経細胞の樹状突起や軸索などの突起形成に効果があることが示された。

請求の範囲

1. セレノプロテインPおよび/または当該蛋白質のC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群を主要構成成分とする運動障害改善剤。
2. 前記蛋白質のC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群が、セレノプロテインPのC末端側260位アミノ酸から362位アミノ酸までのアミノ酸配列、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された当該アミノ酸配列、前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記アミノ酸配列をその一部に含有するアミノ酸配列を有する細胞障害抑制活性を示すペプチドまたは当該ペプチド群である、請求項1記載の運動障害改善剤。
3. 前記蛋白質のC末端側ペプチドもしくは当該ペプチド群が、次式：
- (I) : Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser Glu
Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu (配列番号1)
- および/または
- (II) : Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser Leu
Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile (配列番号2)
- (式中、Xaaはセレノシステインを表す)
- で表されるアミノ酸配列、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された当該アミノ酸配列、前記いずれかのアミノ酸配列の部分配列または前記いずれかのアミノ酸配列をその一部に含有するアミノ酸配列を有するペプチドまたは当該ペプチド群である請求項1または請求項2記載の運動障害改善剤。
4. 運動障害が、神経変性疾患に付随して生じる症候である、請求項1から請求項3のいずれかに記載の運動障害改善剤。
5. 運動障害が、老化、外傷性神経障害疾患、脳血管障害性疾患または免疫異常性疾患に付随して生じる症候である、請求項1から請求項3のいずれかに記載の運動障害改善剤。
6. セレノプロテインPおよび/または当該蛋白質のペプチドもしくは当該ペプチド群を主要構成成分とする神経変性疾患治療剤。
7. 神経変性疾患が、運動失調症、てんかん、運動ニューロン疾患、老化、外傷性神経障害、脳血管障害、免疫異常性疾患より選択される、請求項6に記載の神

WO 02/076492

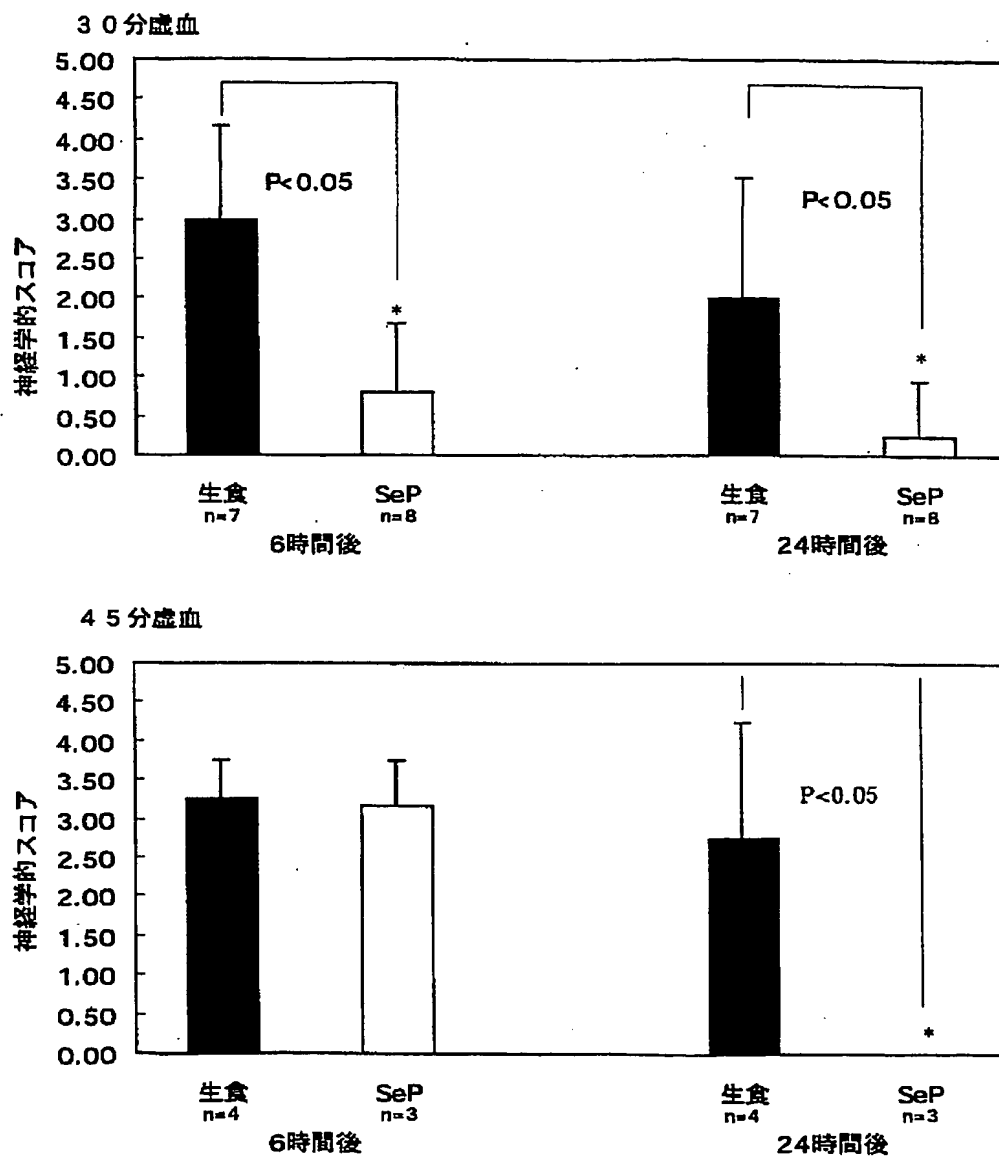
PCT/JP01/07525

17

経変性疾患治療剤。

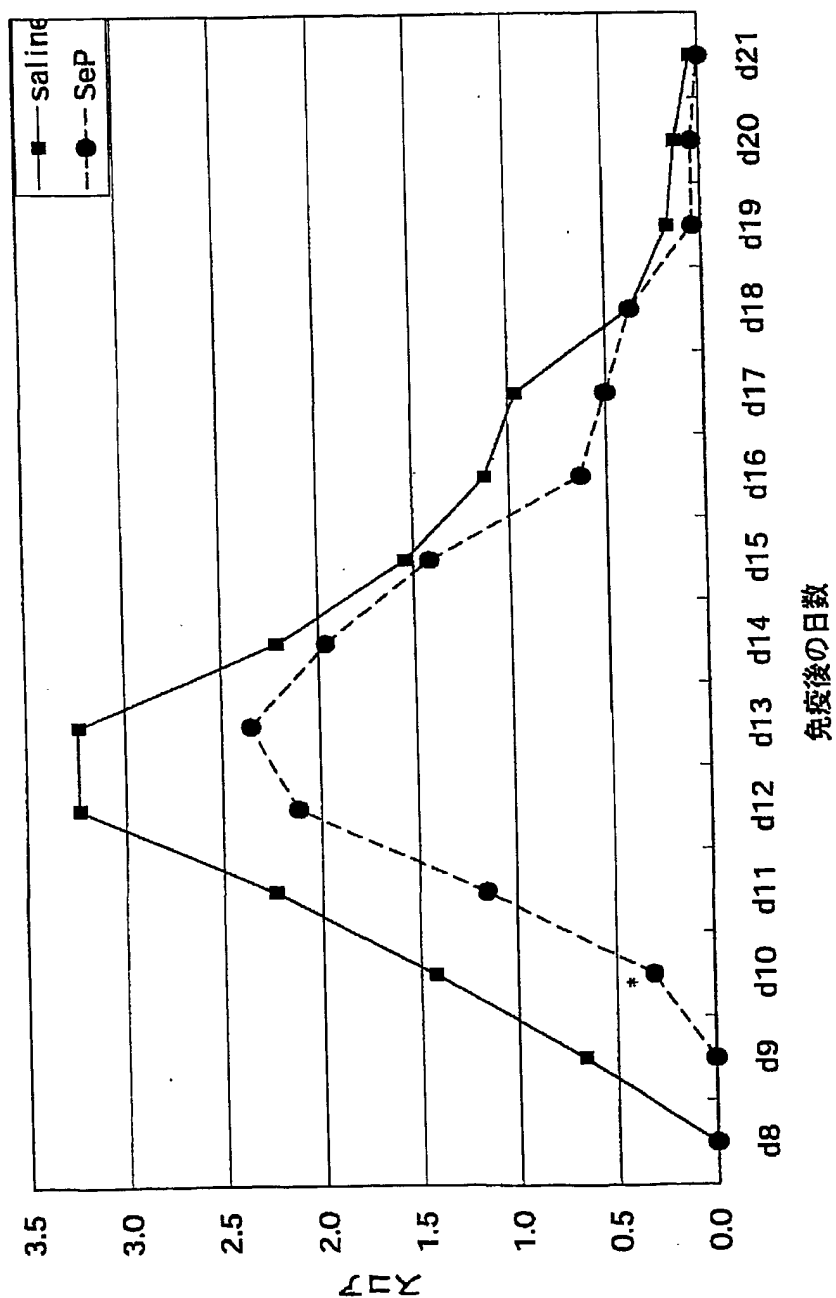
1/3

図 1



2/3

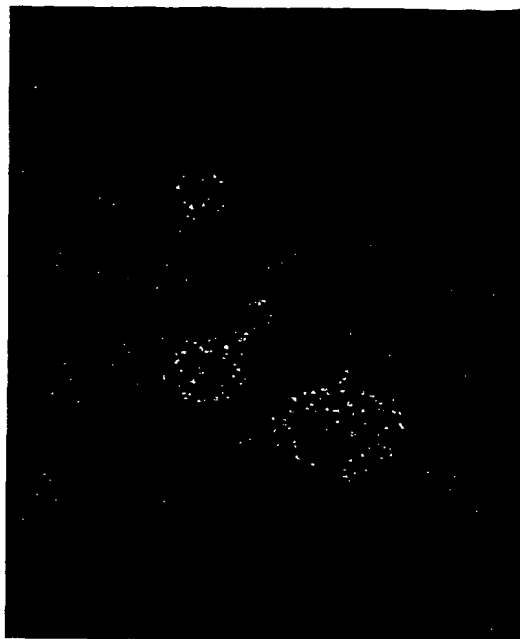
図 2



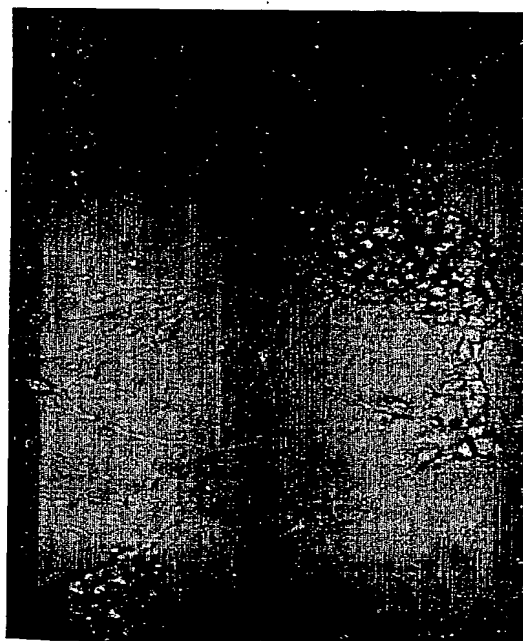
3/3

☒ 3

SeP (-)



SeP (+)



BEST AVAILABLE COPY

1/3

SEQUENCE LISTING

<110> JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE
<120> Novel Remedies for Dyskinesia
<130> 662775
5 <150> JP 2001-84050
<151> 2001-03-23
<160> 6

<210> 1
10 <211> 29
<212> PRT
<213> Human plasma
<220>
<223> Xaa represents selenocysteine
15 <400> 1
Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser
1 5 10 15
Glu Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu
20 25
20 <210> 2
<211> 28
<212> PRT
<213> Human plasma
<220>
25 <223> Xaa represents selenocysteine
<400> 2
Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn Leu Pro Ser
1 5 10 15
Leu Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn Ile

2/3

20

25

<210> 3

<211> 103

5 <212> PRT

<213> Human plasma

<220>

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 3

10 Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser

1 5 10 15

Glu Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile

20 25 30

Phe Glu Lys Thr Gly Ser Ala Ile Thr Xaa Gln Cys Lys Glu Asn

15 35 40 45

Leu Pro Ser Leu Cys Ser Xaa Gln Gly Leu Arg Ala Glu Glu Asn

50 55 60

Ile Thr Glu Ser Cys Gln Xaa Arg Leu Pro Pro Ala Ala Xaa Gln

65 70 75

20 Ile Ser Gln Gln Leu Ile Pro Thr Glu Ala Ser Ala Ser Xaa Arg

80 85 90

Xaa Lys Asn Gln Ala Lys Lys Xaa Glu Xaa Pro Ser Asn

95 100

25 <210> 4

<211> 33

<212> PRT

<213> Human plasma

<220>

3/3

<223> Xaa represents selenocysteine

<400> 4

Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser

1 5 10 15

5 Glu Leu Ala Pro Arg Ser Xaa Cys Cys His Cys Arg His Leu Ile

20 25 30

Phe Glu Lys

33

10 <210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Human plasma

<400> 5

15 Lys Arg Cys Ile Asn Gln Leu Leu Cys Lys Leu Pro Thr Asp Ser

1 5 10 15

Glu Leu Ala Pro Arg Ser

20

20 <210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

25 <223> Myelin proteolipid protein (PLP) synthetic peptide 139-151

<400> 6

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe

1 5 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/07525

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K38/17, A61P25/00, 25/28, 25/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K38/17, A61P25/00, 25/28, 25/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

STN (CA, MEDLINE), DIALOG (BIOSIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 00/31131 A1 (Juridical Foundation the Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute), 02 June, 2000 (02.06.00), especially, Claims; page 13, lines 1 to 7 & EP 1132402 A1	6, 7 1-5
X A	Y. SAITO et al., "Selenoprotein P: Its Structure and Function", Journal of Health Science, (2000), Vol.46, No.6, pages 409 to 413	6, 7 1-5
X A	V. MOSTERT, "Selenoprotein P: Properties, Functions, and Regulation", (2000), Vol.376, No.2, pages 433 to 438	6, 7 1-5
X A	J. YAN et al., "Purification from Bovine Serum of a Survival-Promoting Factor for Cultured Central Neurons and Its Identification as Selenoprotein-P", (1998), Vol.18, No.21, pages 6682 to 8691	6, 7 1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 November, 2001 (27.11.01)Date of mailing of the international search report
11 December, 2001 (11.12.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K38/17, A61P25/00, 25/28, 25/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K38/17, A61P25/00, 25/28, 25/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

STN (CA, MEDLINE), DIALOG (BIOSIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO 00/31131 A1 (財団法人化学及血清療法研究所) 2. 6月. 2000 (02. 06. 00); 特に、特許請求の範囲 及び第13頁第1~7行 & EP 1132402 A1	6, 7 1-5
X A	Y. SAITO et.al, Selenoprotein P: Its Structure and Function, Journal of Health Science, 2000, Vol. 46, No. 6, p. 409-413	6, 7 1-5
X A	V. MOSTERT, Selenoprotein P: Properties, Functions, and Regulation, 2000, Vol. 376, No. 2, p. 433-438	6, 7 1-5

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 11. 01

国際調査報告の発送日

11.12.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 のぶよ



4C 9454

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	J. YAN et al., Purification from Bovine Serum of a Survival-Promoting Factor for Cultured Central Neurons and Its Identification as Selenoprotein-P, 1998, Vol. 18, No. 21, p. 6682-8691	6, 7 1 - 5

THIS PAGE BLANK (USPTO)